

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA ISOFLAVON
PADA AKAR KEDELAI (*Glycine max (L) Merril*)**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
gelar Sarjana Sains (S.Si.) Program Studi Kimia
pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Universitas Islam Indonesia
Jogjakarta**



Disusun Oleh :

**JAMALUL LAIL
No. MHS : 97612001**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JOGJAKARTA
2003**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ISOFLAVONE
IN ROOT OF SOYBEANS (*Glycine max (L) Merril*)**

THESIS

**Submitted to complete apart
of requirements of the Science "Sarjana" degree
in Chemistry Departement
Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Islamic University of Indonesia**



Created by :

**JAMALUL LAIL
Student No. : 97612001**

**CHEMISTRY DEPARTMENT
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
ISLAMIC UNIVERSITY OF INDONESIA
JOGJAKARTA
2003**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA ISOFLAVON
PADA AKAR KEDELAI (*Glycine max (L) Merril*)**

oleh :

JAMALUL LAIL

No Mhs : 97 612 001

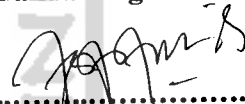
Telah dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 4 September 2003

Dewan Penguji

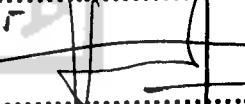
1. Is Fatimah, M.Si.
2. Rudy syahputra, M.Si.
3. Dr. H. Chairil Anwar
4. Tatang Shabur Julianto, S.Si.

Tanda tangan

.....


.....

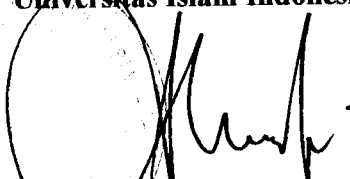

.....

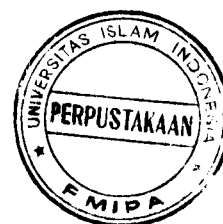

.....


Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia


Jaka Nugraha, M.Si.



MOTTO

"Orang yang beriman dan selalu mengerjakan kebaikan, kami tidak membebani seseorang kecuali sesuai dengan kemampuannya. Mereka itulah yang akan menghuni surga, di sana mereka kekal selamanya."

(Al- A'raaf: 42)

"Undzur maa qala, wala tandzur man qala"

(Rasulullah SAW.)

"Excellence today is no guarantee of excellence tomorrow"

(Frank Friedler)

"Learning without thinking is useless. Thinking without learning is dangerous"

(Confucius)

"In order to succeed, we must first believe that we can"

(Michael Korda)

"Dia yang menundukkan malam untukmu juga siang, matahari, bulan serta bintang-bintang; semuanya tunduk untuk kepentinganmu sesuai dengan perintah-Nya, yang demikian itu merupakan tanda kekuasaan

Tuhan bagi orang yang mau berpikir.

Dia menundukkan bagimu segala ciptaan di bumi yang beraneka ragam, yang demikian itu benar-benar ayat yang menunjukkan kekuasaan Tuhan bagi yang mau mengambil pelajaran."

(An-Nahl: 12-13)

Kupersembahkan karya kecilku ini untuk :

ayahku

ACH. FAQIH (almarhum). Dad.....,
You makes me more bigger than everybody knows.

Ibuku

SATI'AH. Mom.....,
You teach me how to survive

Kakak-kakakku

QUBBATUNNAJAH, ABD. BASHITH,
MARIA ULFA, UMAR JUNID, HUSNUS ZURFAH,
dan MOH. NURUDDIN. Terima kasih ya kak....., kalian semua membuat
aku semakin mengerti bagaimana menjadi diri sendiri.

Mas SAMSUL BAHRI.....

Aku bangga punya kakak sepertimu!

Kak Zulfa....., dan seluruh keluarga besar "SAF" bawean, terima kasih.....!

Buat seluruh Harapan dan masa depan SAF's Family;
Bayu, Yayan, Icha, Adek Arie, Bagus, Nienna, Galuh, Kiki, dan Tata..., buatlah
keluarga kita bangga akan kalian.

Bapak H. Cokro Sumarto,
bapak kostku yang sama sekali tanpa pamrih.

Sri Wulandari, SE., dan keluarga besar M. Syabri, Terima kasih atas
bantuan-bantuannya selama LAIL kuliah di JOGJA.

Kawan-kawan DPM F-MIPA periode 2000-2002, teman-teman HMK, dan
anak-anak teater cangkir, kalian memang pahlawan tanpa tanda jasa.

Para karyawan F-MIPA UII,
kalian memang teman-teman baikku.

*Cah-cah Flamboyan 53 dan alumni Gedang Goreng,
kalian teman-teman terbaikku.*

*Adoy-Dede', Adhisti-Menk, Khamid-Eny, dan Ella, keep lovely guys!
Yanto, Thorik, Deri, Hadi and Friends, thanks a large!, you help me so much.*

*Arek-arek KIMIA SONGOPITU.....,
kalian gak akan aku lupakan.*

BRAVO SCIENCE.....

*Sigit Setiawan....., YOU ARE WILL ALWAYS BE MY BEST FRIEND
FOREVER.*

*Mas Santo....., terima kasih banyak!, slalu mau ngingetin 'n ngasi' motivasi.
Mudah-mudahan cepet bisa ngeraih apa yang udah dicita-citakan.*

Buat seseorang...!.

Terima kasih telah menjadi inspirasiku.

*Aku senang kalau aku meninggalkan sesuatu yang baik buat kamu,
tapi aku mohon maaf kalau aku menyebabkan sesuatu yang tidak baik bagi
kamu.*

*Semoga ALLAH SWT., selalu memberikan petunjuk menuju kejalan yang
benar. Amien...*

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Assalamu 'alaikum Wr. Wb

Alhamdulillah atas segala rahmat, hidayah dan kemudahan yang diberikan Allah SWT., sehingga laporan penelitian yang tertuang di dalam skripsi tentang Identifikasi dan karakterisasi Senyawa Isoflavon Pada Akar Kedelai (*Glycine max (L) Merril*) ini telah berhasil tersusun.

Shalawat dan salam semoga tetap tumpahmelimpahkan selalu kepada junjungan, panutan, dan tauladan yang tercinta, Nabi Muhammad SAW., yang telah membuka wawasan kita akan keutamaan ilmu, sehingga karenanya kita dapat tetap teryakinkan oleh kebesaran Allah SWT., kini hingga hari kemudian esok.

Dalam kesempatan ini penyusun menghaturkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah sangat membantu tersusunnya laporan ini. Terutama kepada yang terhormat:

1. Bapak Jaka Nugraha, M.Si, dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
2. Bapak Riyanto, M.Si, Ketua Jurusan Kimia, atas bantuan-bantuannya.
3. Bapak Dr. H. Chairil Anwar, Dosen Pembimbing I atas bimbingan , dan informasi yang diberikan selama penelitian dan penyusunan skripsi.

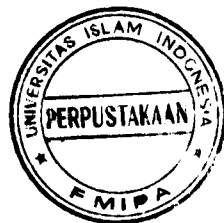
4. Bapak Tatang Shabur Julianto, S.Si, Dosen Pembimbing II yang telah bersedia meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan dan dukungan.
5. Ibu Is Fatimah, kepala Laboratorium Kimia, atas ijin yang diberikan selama penelitian dilaksanakan.
6. Para dosen-dosen yang telah mengajar saya selama saya kuliah di jurusan kimia F-MIPA UII
7. Staf Laboratorium terpadu, atas bantuannya selama penelitian berlangsung. Pak Luluk, Pak Irman, Pak Dwi, Mbak Nura, Mbak Diah, mas Hartanto, dan pak Eko. Terima kasih banyak, hanya Allah SWT. yang bisa membalas segala bantuannya.

Dan semua pihak yang membantu saya dalam setiap perkuliahan dan tahap penyusunan skripsi yang tidak bisa disebutkan satu persatu, semoga ALLAH SWT., berkenan memberikan balasan yang berlimpah dan tidak terduga.

Selanjutnya saran dan perbaikan sangat diharapkan untuk tersusunnya skripsi yang lebih baik. Semoga hasil dari skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Amien...

Wabillahi taufiq wal hidayah

Wassalaamu 'alaikum Wr. Wb.



Jogyakarta, 4 September 2003

Penyusun

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PENGESAHAN	ii
MOTTO	iii
PERSEMBAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
INTISARI.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
BAB III DASAR TEORI.....	8
3.1 Tinjauan Botani Kedelai.....	8
3.1.1 Taksonomi.....	8
3.1.2 Morfologi	9

3.2 Senyawa Flavon dan Isoflavon	11
3.2.1 Biosintesis Flavon dan Isoflavon	13
3.3 Ekstraksi	15
3.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	15
3.5 Spektroskopi Ultraviolet dan tampak	18
3.6 Hipotesis	20
BAB V METODOLOGI PENELITIAN	21
5.1 Alat dan Bahan yang Digunakan.....	21
5.1.1 Alat yang digunakan	21
5.1.2 Bahan yang digunakan.....	21
5.2 Jalan Penelitian	22
5.2.1 Pembuatan tepung sampel	22
5.2.2 Penyiapan ekstrak sampel	22
5.2.3 Identifikasi senyawa isoflavon	23
5.2.4 Karakterisasi dengan spektrofotometer UV-Vis.....	23
BAB VI HASIL DAN PEMBAHASAN	25
6.1 Pengambilan Sampel.....	25
6.2 Ekstraksi Akar Kedelai.....	25
6.3 Hasil Pemisahan dengan KLT	26
6.4 Penentuan Struktur Senyawa Isoflavon dengan Metode Uji Warna.....	27
6.5 Analisis dengan Spektrofotometer ultraviolet.....	28

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	31
7.1 Kesimpulan.....	31
7.2 Saran	31

DAFTAR PUSTAKA



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Harga Rf dan warna noda dengan lampu UV 366 nm	26
Tabel 2. Warna noda pada lampu UV 366 nm menggunakan uap NH ₃	28
Tabel 3. Panjang gelombang maksimum fraksi 1 dalam metanol.....	30
Tabel 4. Pergeseran batokromik pada penambahan pereaksi geser	30



**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ISOFLAVONE
IN ROOT OF SOYBEANS (*Glycine max (L) Merril*)**

ABSTRACT

Jamalul Lail

Student No.: 97612001

Beside of high nutrient food soybeans contain active compounds of medicinal values like isoflavones.

Isolation and characterization of isoflavone compound from root of soybean have been carried out. The isolation by extraction method, and TLC (Thin Layer Chromatography) have been done.

Identification structure of compounds have been carried out by using ultraviolet-visible spectrophotometer using shift reagents NaOH, AlCl₃, and NaOAc.

The addition of NaOH solution caused bathochromic shift to methanol spectrum about 18 nm, showed existing of 5-OH and 4'-OH group. The addition of AlCl₃ gave bathochromic shift about 8 nm, showed existing of 5-OH group and ketones, and the addition of NaOAc was not gave bathochromic shift, that was not showed existing of 7-OH group, or C7 at A ring in the shape of glycosides isoflavones.

Genistein 7-O-glycosides showed maximum wavelength while at 261 nm, and compound of fraction 1 absorbed at 271.5 nm. Data above have identified that compound in fraction 1 is genistein 7-O-glycosida

Keywords: soybeans, isoflavon, TLC, UV-Vis spectrophotometer, genistein 7-O-glycosida

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia sebagai negara agraris memiliki kekayaan alam tanaman obat berlimpah yang tersebar diseluruh gugusan pulau-pulaunya. Penggunaan tanaman obat ini sudah berlangsung lama oleh nenek moyang bangsa Indonesia. Ada beberapa tumbuhan yang sudah diketahui khasiatnya secara alamiah, salah satunya adalah kedelai. Selain digunakan sebagai bahan makanan, kedelai juga diketahui dapat berperan sebagai bahan obat karena kandungan senyawa kimia yang dimilikinya.

Kedelai (*Glycine max (L) Merril*) merupakan bahan dasar makanan yang sudah tidak asing bagi masyarakat Indonesia. Pada mulanya menurut Rhumpius dalam Suprpto (1983) melaporkan bahwa pada tahun 1750 kedelai sudah mulai dikenal sebagai bahan makanan dan pupuk hijau di Indonesia. Daerah sentral tanaman kedelai di Indonesia awalnya hanya terpusat dipropinsi Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, Lampung, Nusa Tenggara Barat, dan Bali (Rukmana, dkk, 1996). Kemudian penanaman kedelai meluas hampir diseluruh Indonesia.

Sampai saat ini makanan dengan bahan dasar kedelai relatif murah dan sering kurang dihargai. Hal tersebut disebabkan kurangnya pengetahuan masyarakat tentang manfaat tanaman kedelai bagi kesehatan tubuh.

Tingginya kandungan protein kedelai mempunyai peran yang sangat besar bagi penyediaan bahan pangan bergizi bagi penduduk dunia, sehingga disebut sebagai "gold from the soil" (emas yang muncul dari tanah) dan juga sebagai "the worlds miracle" karena kandungan proteinnya kaya akan asam amino essensial.

Selain memiliki nilai gizi tinggi, kedelai juga mengandung suatu fitonutrien yang mampu mencegah tumbuhnya kanker. Fitonutrien merupakan zat yang tidak termasuk dalam kategori karbohidrat, protein, lemak, vitamin, atau mineral (senyawa metabolit primer), namun memiliki peran yang penting bagi tubuh (senyawa metabolit sekunder).

Isoflavon merupakan salah satu fitonutrien yang terkandung dalam tanaman kedelai. Senyawa tersebut berfungsi sebagai zat antioksidan yang dapat melindungi sel dari kerusakan akibat molekul oksigen yang tidak stabil (radikal bebas). Radikal bebas ini dianggap bertanggung jawab dalam setiap timbulnya penyakit kanker (Darmawan, 2001).

Pada pasca panen kedelai dapat diolah lebih lanjut menjadi berbagai macam bahan makanan olahan. Beberapa hasil olahan kedelai yang sudah banyak dipraktikkan pada skala industri berskala kecil, menengah dan atas antara lain tempe, tahu, kecap, tauco, dan susu kedelai. Semua produk olahan kedelai tersebut selain merupakan bahan makanan yang enak dan lezat juga memiliki nilai gizi tinggi.

Namun setelah diambil bijinya, limbah tanaman kedelai berupa *brangkasan* (daun, batang, dan akar) hanya digunakan sebagai bahan makanan tambahan (konsentrat) pada ternak dan pupuk organik penyubur tanah.

Biji kedelai dalam penelitian sebelumnya diketahui mengandung senyawa isoflavon. Sehingga diasumsikan selain pada biji, senyawa isoflavon juga terkandung dalam bagian lain pada tanaman kedelai, seperti akar. Dengan asumsi tersebut, maka akan dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa isoflavon pada akar kedelai tersebut, sehingga dapat lebih bernilai ekonomi tinggi.

Untuk mengisolasi senyawa isoflavon digunakan metode ekstraksi, soxhletasi, dan KLT preparatif digunakan untuk identifikasi. Sedangkan untuk karakterisasi digunakan spektrofotometer UV-Vis.

Karena hal tersebut di atas, maka informasi tentang potensi dan pemanfaatan senyawa isoflavon pada tanaman kedelai dapat digunakan oleh masyarakat dalam menunjang bidang kesehatan dan perkembangan industri obat-obatan.

1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah akar kedelai mengandung senyawa isoflavon
2. Senyawa isoflavon apa yang terkandung dalam akar kedelai

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengoptimalkan limbah tanaman kedelai pasca panen menjadi lebih bernilai ekonomi tinggi
2. Memperoleh data empiris tentang kandungan senyawa isoflavon pada akar tanaman kedelai

1.4 Manfaat Penelitian

1. Data yang diperoleh dapat dimanfaatkan oleh instansi terkait terutama untuk industri obat-obatan
2. Limbah tanaman kedelai dapat dimanfaatkan sebagai obat alternatif antikanker selain kacang kedelai



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Penentuan kandungan suatu senyawa dalam tumbuhan khususnya senyawa flavonoid isoflavon telah banyak dilakukan. Metode pemisahan dengan kromatografi merupakan metode yang paling banyak digunakan, seperti kromatografi kertas (KKt), kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi gas cair (KGC) dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Harborne, 1987).

Analisis kualitatif senyawa isoflavon pernah dilakukan oleh Shigemitsu, dkk (1991) menggunakan KLT, UV-Vis, Spektroskopi Massa, dan RMI - ^1H , sedangkan Analisis secara kuantitatif dapat dilakukan dengan metode KCKT (Ewan, dkk, 1992).

Penentuan kandungan senyawa isoflavon pada kedelai pernah dilakukan oleh Naim, dkk (1973). Senyawa isoflavon tersebut ialah glisitein (7,4'-dihidroksi 6- metoksiisoflavon, tetapi selain hanya dilakukan pada buahnya saja kedelai juga masih mengandung senyawa isoflavon lain yang juga penting pemanfaatannya untuk bahan obat. Selain itu juga diperoleh data tentang aktifitas antifungi yang dimiliki oleh senyawa isoflavon tersebut (Kramer, dkk, 1984).

Walz (1931) dan Walter (1941) dalam Naim, dkk (1974) melaporkan bahwa selain mengandung 2 (dua) senyawa isoflavon glikosida (genistin dan daidzin), kedelai juga mengandung senyawa isoflavon aglikon dari masing-masing glikosidanya.

Kemudian lebih lanjut Naim, dkk (1974) melakukan penelitian yang sama mengenai senyawa isoflavon kedelai menghasilkan data empiris, yaitu total kandungan senyawa isoflavon dalam kedelai sebesar 0,25 %, dimana 99 % isoflavon dapat terdeteksi sebagai glikosidanya, antara lain, 64 % genistin, 23 % daidzin, dan 13 % glisitein 7-O- β - glikosida.

Adapun sifat-sifat senyawa isoflavon aglikon kedelai yang sudah diketahui antara lain; genistein (4',5,7- trihidroksi isoflavon), BM = 270,23 gr/mol, dengan titik lebur 297 - 298 °C ; daidzein (4',7 -dihidroksi isoflavon), BM = 254,23 gr/mol, berbentuk kristal dengan titik lebur 315 – 323 °C (Markham, 1988)

Penelitian tentang senyawa isoflavon terus berkembang hingga pada tahap bioaktivitas terhadap berbagai penyakit. Gyorgy, dkk (1964) melakukan penelitian tentang aktivitas senyawa isoflavon yang menunjukkan bahwa senyawa isoflavon daidzein dan genistein memiliki aktivitas antioksidan. Kemudian penelitian tersebut diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Murakami, dkk (1984) yang menyatakan bahwa komponen utama yang memberikan respons pada aktivitas dan stabilitas antioksidan adalah daidzein dan genistein.

Genistein merupakan senyawa isoflavon aglikon (bebas) yang banyak diyakini berpotensi sebagai senyawa antitumor/antikanker. Potensi tersebut antara lain menghambat perkembangan sel kanker payudara (Lamastiniere, dkk, 1996), dan sel kanker hati (Heindrich, dkk, 1996). Fujiki, dkk (1986) menjelaskan bahwa proses penghambatan sel kanker oleh senyawa isoflavon terjadi khususnya pada fase promosi.

Berbagai penelitian yang telah dijelaskan diatas hanya berdasarkan pada sampel biji kedelai dan bahan makanan olahan dari biji kedelai. Banyaknya limbah tanaman kedelai pasca panen (brangkasan), dapat dimanfaatkan sebagai bahan bernilai ekonomi tinggi, yaitu bahan baku untuk kebutuhan obat. Penelitian ini dapat memberikan informasi tentang kandungan senyawa isoflavon pada akar kedelai tersebut.



BAB III

DASAR TEORI

3.1 Tinjauan Botani Kedelai

3.1.1 Taksonomi

Kedudukan tanaman kedelai (*Glycine max* (L) Merr.) dalam sistematika tumbuhan (taksonomi) menurut Lawrence (1958) dalam Darmawan (2001) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub Divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Polypetales</i>
Famili	: <i>Leguminoceae</i> (<i>Papilionaceae</i>)
Sub Famili	: <i>Papilinodeae</i>
Genus	: <i>Glycine</i>
Species	: <i>Glycine max</i> (L) Merril. Sinonim dengan <i>G. soya</i> (L) sieb dan <i>zucc</i> atau <i>Soya max</i> atau <i>s. Hispida</i>

Spesies paling dekat dengan kedelai budidaya (*G. max*) adalah kedelai liar misalnya *G. elandestina* dan *G. Usuriensis*. Kedelai dikenal dengan beberapa nama lokal diantaranya kedelai kacang jepung, kacang bulu, gadela, dan

demokam. Di Jepang dikenal dengan adanya kedelai rebus (edomame) atau kedelai manis, dan kedelai hitam (koromame).

Sedangkan nama umum didunia disebut soybean. Para ahli botani mencatat suku kacang-kacangan (*popilionaceae*) yang tumbuh didunia mempunyai 690 generasi dan sekitar 18.000 species (Rul:mana, dkk, 1996).

3.1.2 Morfologi

Susunan tubuh tanaman kedelai terdiri atas dua macam alat organ utama, yaitu organ vegetatif dan generatif. Organ vegetatif meliputi akar, batang, dan daun, yang berfungsi sebagai alat pengambil, pengangkut, pengolah, pengedar, dan penyimpan makanan, sehingga disebut sebagai alat hara (organ nutritivum). Sedangkan organ generatif meliputi bunga, buah, dan biji, yang berfungsi sebagai alat berkembang biak (organum reproductivum).

Struktur akar tanaman kedelai terdiri atas akar lembaga (*radicula*), akar tunggang (*radix primaria*), akar cabang (*radix lateralis*) berupa akar rambut. Perakaran kedelai pada tanah yang subur dapat menembus tanah pada kedalaman ± 150 cm (Rukmana, dkk, 1996).

Tanaman kedelai termasuk berbatang semak yang dapat mencapai ketinggian antara 30-100 cm. Batang ini beruas-ruas dan memiliki percabangan antara 3-6 cabang. Bila jarak tanaman dalam barisan rapat, maka percabangannya dapat berkurang atau tidak bercabang sama sekali (Suprpto, 1983). Tipe pertumbuhan tanaman kedelai dibedakan atas 3 (tiga) macam, yaitu tipe determinate, semi determinate, dan indeterminate.

Tipe determinate mempunyai ciri-ciri antara lain ujung tanaman lebih kecil dibandingkan batang tengah, pembungaannya berlangsung secara serempak (bersamaan), pertumbuhan vegetatif akan berhenti setelah berbunga.

Tinggi tanaman termasuk kategori pendek sampai sedang, dan daun paling atas ukurannya sama besar dengan daun pada bagian batang tengah.

Tipe indeterminate mempunyai ciri-ciri antara lain ujung tanaman lebih kecil dibandingkan dengan batang tengah, ruas-ruas batangnya panjang dan agak melilit, pembungaannya berangsur-angsur dari bagian pangkal ke bagian batang atas, pertumbuhan vegetatif terus-menerus setelah berbunga, tinggi batang termasuk kategori sedang sampai tinggi, dan ukuran daun paling atas lebih kecil dibandingkan dengan daun pada bagian tengah.

Sedangkan tipe semi determinate mempunyai ciri-ciri diantara tipe determinate dan indeterminate. Walaupun demikian pada umumnya varietas yang sering ditanam para petani termasuk tipe determinate atau indeterminate.

Daun kedelai mempunyai ciri-ciri antara lain helai daun (lamina) oval dan tata letaknya pada tangkai daun bersifat majemuk berdaun tiga (trifoliolatus). Daun ini berfungsi sebagai alat untuk proses asimilasi, respirasi, dan transpirasi.

Tanaman kedelai memiliki bunga sempurna (hermaphrodite), yakni pada tiap kuntum bunga terdapat alat kelamin betina (putik) dan kelamin jantan (benangsari). Kuntum bunga tersusun dalam rangkaian bunga, namun tidak semua bunga dapat menjadi polong (buah). Menurut Rukmana (1996) sekitar 60% bunga akan rontok sebelum membentuk polong.

Buah kedelai disebut "polong", yang tersusun dalam rangkaian buah. Tiap polong kedelai berisi antara 1-4 biji. Jumlah polong per tanaman tergantung pada varietas kedelai, kesuburan tanah, dan jarak tanam yang digunakan. Kedelai yang ditanam pada tanah subur pada umumnya dapat menghasilkan antara 100-200 polong/pohon.

3.2 Senyawa Flavon dan Isoflavon

Senyawa flavonoid untuk obat awalnya diperkenalkan oleh seorang ilmuwan Amerika bernama S. Gyorgy (1996) yang sekaligus sebagai pionir (pembuka) penggunaan senyawa tersebut dibidang therapeutik. Gyorgy (Anonim, 1998) secara tidak sengaja memberikan ekstrak vitamin C (asam askorbat) kepada seorang dokter untuk diberikan kepada seorang pasien penderita pendarahan kapiler subkutaneus, ternyata pasien tersebut dapat disembuhkan.

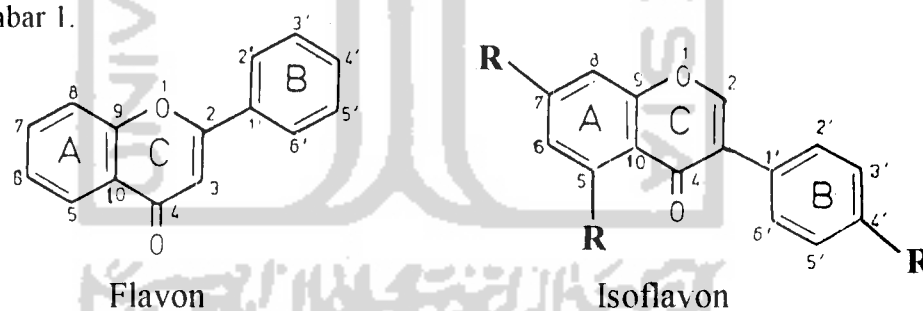
Namun pada pengobatan terhadap pasien yang lain dengan menggunakan ekstrak vitamin C yang dimurnikan, ternyata ekstrak ini tidak dapat menyembuhkan penderita. Kemudian Gyorgy menemukan senyawa yang disebut "bioflavonoids" atau vitamin P yang dinyatakan sebagai anti *hemorrhage* (pendarahan), (Anonim, 1998).

Flavonoid dan isoflavonoid adalah salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang banyak terdapat pada tumbuhan khususnya dari golongan *leguminoceae* (tanaman berbunga kupu-kupu).

Kandungan senyawa flavonoid dalam tanaman sekitar 0,25 % dan senyawa-senyawa tersebut pada umumnya dalam keadaan terikat (konyugasi)

dengan senyawa gula (Snyder dan Kwon, 1987). Tidak seperti senyawa metabolit sekunder yang lain, senyawa flavonoid juga tidak dapat disintesis oleh mikroorganisme, sehingga mikroorganisme tidak mempunyai kandungan senyawa tersebut.

Senyawa flavonoid aglikon dalam tumbuhan terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semuanya mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi $C_6 - C_3 - C_6$, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tak dapat membentuk cincin ketiga. Untuk dapat mudah dipahami, maka cincin diberi tanda A, B, dan C; untuk cincin A dan C atom karbon dinomori menurut system penomoran yang menggunakan angka biasa, sedangkan cincin B diberi tanda angka "beraksen", Markham (1988). Struktur umum senyawa flavon dan isoflavon dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Struktur umum senyawa flavon dan isoflavon

Secara umum senyawa isoflavon dibedakan menjadi 2 (dua) macam, yaitu senyawa isoflavon aglikon (bebas) yang bermanfaat untuk kebutuhan obat-obatan, dan senyawa isoflavon glikosida (terikat oleh senyawa gula), dimana senyawa gula yang terikat tersebut dapat dihilangkan dengan hidrolisis asam dan hidrolisis enzim.

3.2.1 Biosintesis flavon dan isoflavon

Flavon dan isoflavon secara alami disintesis oleh tumbuh-tumbuhan dari senyawa asam amino aromatik fenil alanin atau tirosin, biosintesis ini berlangsung bertahap dan melalui sederetan senyawa antara lain : (i) asam sinamat, (ii) asam kuramat, (iii) kalkon, dan (iv) flavon dan isoflavon.

Berdasarkan biosintesis tersebut maka flavon dan isoflavon digolongkan sebagai senyawa metabolit sekunder, namun tidak terdapat pada mikroorganisme seperti; bakteri, algae, jamur dan lumut, karena mikroorganisme tersebut tidak mempunyai kemampuan untuk mensintesis.

Walaupun demikian mikroba-mikroba tertentu mempunyai kemampuan untuk melakukan transformasi senyawa isoflavon (Luckner,1984). Senyawa ini pada umumnya bukan merupakan kebutuhan fisiologis pokok dari mikroba baik untuk pertumbuhan maupun aktivitas kehidupannya. Meskipun tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan namun dapat juga berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk mempertahankan hidup.

Senyawa metabolisme sekunder biasanya terbentuk pada saat tidak adanya sel akibat keterbatasan zat gizi dalam medium, marangsang dihasilkannya enzim-enzim yang berperan dalam pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit primer guna mempertahankan kelangsungan hidup.

Walaupun mikroorganisme dapat mensintesis fenil alanin dan tirosin yang merupakan unit-unit prekursor dari biosintesis senyawa flavonoid, namun mikroorganisme tidak mempunyai kemampuan untuk memperpanjang unit C₆-C₃ dengan penambahan unit dua karbon (Geissman, 1962) bahkan organisme yang

lebih tinggi yaitu golongan lumut (*bryophyta*) belum mampu mensintesis senyawa flavonoid, dan hanya pada golongan paku-pakuan (*pteridophyta*) yang mampu mensintesis senyawa ini. (Anonim, 1998).

Isoflavon termasuk dalam golongan flavonoid (1,2-diaril propan) yang merupakan bagian kelompok terbesar dalam golongan tersebut. Salah satu sumber senyawa isoflavon adalah kedelai yang termasuk dalam golongan tanaman kacang-kacangan (*leguminoceae*). Kedelai banyak dikonsumsi melalui berbagai produk olahan antara lain tempe, tahu, tauco, kecap dan susu. Berbagai jenis senyawa isoflavon yang terdapat pada kedelai adalah daidzein, genistein, glisitein, baik dalam keadaan bebas (aglikon) maupun dalam keadaan terikat (konyugasi) melalui ikatan glikosida dengan senyawa gula (Barz,dkk, 1990)

Senyawa isoflavon makin menarik perhatian karena dari hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa ini telah terbukti berpotensi sebagai senyawa aktif yang bermanfaat sebagai obat sampai saat ini lebih dari 200 senyawa telah berhasil diidentifikasi (Harborne, 1987), dan lebih dari 100 jenis senyawa dinyatakan mempunyai aktifitas biologis.

Berbagai aktivitas senyawa isoflavon secara biologis antara lain aktifitas estrogenik, insektisida, anti-fungi anti-oksidan, anti inflamasi, anti hemolisis, dan sebagainya (Anonim, 1998).

3.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu komponen yang diinginkan dari penyusun-penyusun lain dalam suatu campuran. Berdasarkan jenis fasanya, maka ekstraksi dapat berupa ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair.

Ekstraksi cair-cair diklasifikasikan berdasarkan pada hukum distribusi yang menyatakan bahwa “jika pada suatu system yang terdiri dari dua lapisan cairan yang tidak larut sesamanya ditambahkan senyawa ketiga, maka senyawa ketiga tersebut akan terdistribusi diantara kedua lapisan cairan tersebut”.

Ekstraksi soxhletasi digunakan untuk isolasi senyawa dari bahan padat menggunakan pelarut tertentu sesuai dengan senyawa yang akan dipisahkan. Pemilihan pelarut berdasarkan kaidah “like dissolved like”, yang berarti suatu senyawa polar akan larut dalam pelarut polar, dan senyawa non polar akan larut dalam pelarut non polar. Pelarut-pelarut yang biasa dipakai dalam ekstraksi soxhletasi antara lain; alkohol, kloroform, eter minyak bumi, n-heksana, dietil eter, dan lain sebagainya.

Keuntungan dari ekstraksi soxhletasi adalah kebutuhan akan pemanasan minimal, sehingga diharapkan tidak merusak komponen penyusun ekstraktan yang diperoleh, dan proses ekstraksi dapat berlangsung berulang-ulang secara otomatis sampai ekstraksi sempurna (Furniss, dkk, 1978).

3.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Teknik kromatografi lapis tipis (KLT) pada mulanya dikembangkan tahun 1938 oleh Ismailof dan Schraiber (Khopkar, 1990). Adsorben dilapiskan pada

lempeng kaca yang bertindak sebagai penunjang fasa diam, sedangkan fasa gerak akan merayap sepanjang fasa diam dan membentuk kromatogram, yang juga dikenal sebagai kromatografi kolom terbuka. Metode kromatografi ini sederhana, cepat, dan sensitive dalam pemisahan. Kecepatan pemisahan tinggi dan mudah untuk memperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan.

Materi pelapis yang paling sering digunakan adalah silika gel, tetapi zat pelapis lain seperti bubuk selulosa dan tanah diatome (kieselguhr) juga dapat digunakan. Untuk fasa diam hidrofilik dapat digunakan pengikat seperti semen paris, kanji, dispersi koloid plastik, dan silika terhidrasi. Untuk mendapatkan hasil analisis yang reproduibel, maka kadar air dalam lapisan harus terkendali.

Pemilihan sistem pelarut dan komposisi lapisan tipis ditentukan oleh prinsip kromatografi yang akan digunakan. Untuk meneteskan sampel yang akan dipisahkan digunakan suatu mikro-syringe (penyuntik berukuran mikro). Sampel diteteskan pada salah satu bagian tepi plat kromatografi (sebanyak 0,01-10 μg zat).

Semua teknik yang digunakan untuk kromatografi kertas dapat juga dipakai untuk kromatografi lapis tipis, tetapi resolusi KLT jauh lebih tinggi daripada kromatografi kertas karena laju difusi yang luar biasa kecilnya pada lapisan pengadsorpsi.

Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) didasarkan pada sistem distribusi fasa cair-padat. Zat padat sebagai fasa diam, dimana adsorbennya berupa lapisan tipis alumina atau silika gel yang menempel pada permukaan seleinbar lempengan kaca atau plastik. Sedangkan zat cair sebagai fasa gerak adalah eluen yang

digunakan untuk membawa zat yang dianalisis bergerak melalui fasa diam. Fasa diam harus mempunyai sifat yang tidak larut dalam fasa gerak maupun dalam komponen cuplikan (Braun, 1982).

Pemilihan fasa gerak yang sesuai untuk pengembangan bergantung pada sifat senyawa yang akan dipisahkan. Senyawa yang bersifat polar akan lebih cepat terelusi dengan menggunakan pelarut yang polar juga, begitu juga sebaliknya, senyawa yang bersifat non polar akan lebih cepat terelusi dengan menggunakan pelarut non polar.

Touchstone, dkk (1983) menyatakan bahwa urutan kenaikan polaritas pelarut-pelarut yang umum digunakan adalah:

Eter minyak bumi < CCl_4 < Benzena < CH_3Cl < Dietil eter < Etil asetat < Piridin < aseton < n-propanol < etanol < metanol < air

Sistem pelarut campuran, terutama dua macam pelarut sering dipakai sebagai eluen KLT. Keuntungan menggunakan system ini adalah daya elusi pelarut dapat diatur dengan merubah perbandingan campuran. Namun kelemahan yang dimiliki menghasilkan ulangan yang relatif kurang baik, karena campuran setelah beberapa kali pengembangan mengalami perubahan sedikit demi sedikit.

Penentuan lokasi noda dari senyawa-senyawa setelah pemisahan pada plat lapis tipis dapat digunakan 2 (dua) metode, yaitu metode fisika dan metode kimia (Touchstone, dkk, 1983). Untuk metode fisika digunakan lampu UV 254 nm dan 366 nm, sedangkan untuk metode kimia pada umumnya digunakan pereaksi semprot yang menghasilkan noda dengan warna karakteristik.

Identifikasi dari senyawa yang terpisah pada plat lapis tipis umumnya menggunakan harga Rf (Retardation factor), yang dirumuskan:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa dari titik awal}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut dari titik awal}}$$

Harga-harga Rf untuk senyawa-senyawa yang dianalisis dibandingkan dengan harga Rf senyawa murni.

Kemudian Touchstone, dkk (1983) menyatakan keuntungan metode KLT dibandingkan dengan metode kromatografi lain antara lain:

1. Senyawa yang dipisahkan pada umumnya dapat terdeteksi langsung oleh mata atau kadang-kadang dengan Rf spesifik.
2. Waktu yang diperlukan untuk pergantian satu kondisi pemisahan tertentu relatif singkat (setengah jam).
3. Metode KLT dimungkinkan mengadakan beberapa pemisahan.
4. Keuntungan utama metode KLT adalah penghematan bahan dan waktu.

Keberhasilan pemisahan dengan metode KLT sangat dipengaruhi oleh interaksi antara tiga komponen yang terlibat, yaitu fasa gerak dengan zat terlarut, zat terlarut dengan padatan penyerap, dan fasa gerak dengan padatan penyerap.

3.5 Spektroskopi Ultraviolet dan tampak

Spektroskopi serapan ultraviolet merupakan cara yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid. Keuntungan utama metode analisis ini

adalah sangat sedikitnya cuplikan yang diperlukan dalam serangkaian analisis lengkap (Markham, 1988).

Spektroskopi merupakan metode analisis yang didasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik dengan suatu senyawa (Day dan Underwood, 1986). Apabila radiasi gelombang elektromagnetik dilewatkan pada suatu senyawa, maka sebagian radiasi akan diserap oleh suatu molekul dengan panjang gelombang tertentu sesuai dengan struktur molekul tersebut. Setiap senyawa mempunyai perbedaan energi tingkat dasar dan tingkat tereksitasi spesifik, sehingga akan menyerap sejumlah frekuensi tertentu. Hubungan antara intensitas radiasi dengan frekuensi atau panjang gelombang disebut dengan spektrum serapan (Sastrohamidjojo, 1985).

Pelarut yang biasa dipakai dalam analisis spektrofotometer ultraviolet adalah metanol dan etanol 95%, karena kebanyakan golongan senyawa flavonoid larut dalam pelarut tersebut. Pelarut lain yang juga sering digunakan antara lain; air, n-heksana, dan eter, sedangkan pelarut seperti kloroform dan piridin sebaiknya dihindari (Markham, 1988).

Isoflavon merupakan senyawa flavonoid dengan sistem aromatis terkonyugasi, sehingga memberikan serapan pada spektrum UV-vis. Spektrum khas isoflavon terdiri dari 2 (dua) puncak, yaitu pada rentang 245-275 nm (pita II) dan 310-330 nm (pita I) (Markham, 1988).

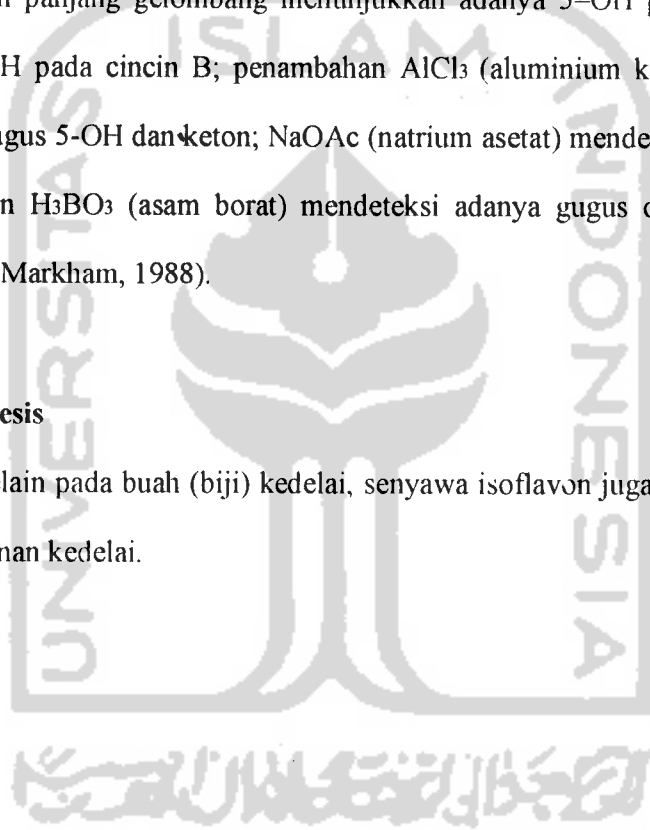
Untuk membantu menentukan jenis flavonoid, pola oksigenasi dan letak gugus hidroksil pada flavonoid aglikon, dilakukan penambahan pereaksi geser. Pereaksi geser dapat ditambahkan pada sampel yang sudah dilarutkan terlebih

dahulu dalam pelarut, seperti methanol atau etanol 95%. Keragaman rentang serapan maksimum yang dihasilkan bergantung pada pola hidroksilasi dan substitusi dari senyawa tersebut.

Pereaksi geser yang biasa ditambahkan, yaitu penambahan NaOMe (natrium metoksida) yang dapat diganti dengan NaOH 2M. Jika menyebabkan pergeseran panjang gelombang menunjukkan adanya 5-OH pada cincin A dan atau 4'-OH pada cincin B; penambahan $AlCl_3$ (aluminium klorida) mendeteksi adanya gugus 5-OH dan keton; NaOAc (natrium asetat) mendeteksi adanya gugus 7-OH; dan H_3BO_3 (asam borat) mendeteksi adanya gugus orto-hidroksil pada cincin A (Markham, 1988).

3.6 Hipotesis

Selain pada buah (biji) kedelai, senyawa isoflavon juga terkandung dalam akar tanaman kedelai.



BAB IV
METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Alat dan Bahan yang Digunakan

4.1.1 Alat yang digunakan

1. Spektrofotometer UV-Vis merk Hitachi model U-1020
2. Kromatografi lapis tipis kresgel 60 F 254
3. Lampu UV 254 nm dan 366 nm
4. Seperangkat alat Soxhlet
5. Blender Merk Philips HR 2815
6. Oven
7. Corong pisah
8. Pipa kapiler
9. Kertas saring
10. Alat-alat gelas lain.

4.1.2 Bahan yang digunakan

1. n-heksana teknis CV. ORGANIK
2. Metanol p.a.; 99,8 % (v/v) Produksi E. MERCK
3. Etanol p.a.; 99,8% (v/v) Produksi E. MERCK
4. Kloroform p.a.; 99,4% (v/v) Produksi E. MERCK
5. Amoniak p.a.; 25% (v/v) Produksi E. MERCK

6. HCl p.a.; 37% (v/v) Produksi E. MERCK
7. Akuades
8. NaOH 2M
9. Serbuk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Produksi E. MERCK
10. Serbuk NaOAc anhidrat Produksi E. MERCK
11. Serbuk H_3BO_3 Produksi E. MERCK

4.2 Jalan Penelitian

4.2.1 Pembuatan tepung sampel

Akar kedelai yang diperoleh dipotong kecil-kecil, keringkan dalam oven, kemudian haluskan dengan blender menjadi tepung. Pisahkan lemak/minyak yang terkandung didalam akar tanaman kedelai tersebut dengan metode Soxhletasi menggunakan n-heksana selama 3-4 jam. Kemudian uapkan n-heksana yang tersisa sehingga dihasilkan tepung sampel bebas lemak/minyak.

4.2.2 Penyiapan ekstrak sampel

Dua ratus gram tepung bebas lemak/minyak, ditambahkan 400 mL metanol 80%. Kemudian simpan dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C selama 6-12 jam (satu malam). Campuran tersebut selanjutnya disaring dan uapkan pelarutnya pada suhu 40 °C.

Residu yang tertinggal dilarutkan kembali dengan 120 mL metanol murni, uapkan kembali supernatan sampai setengahnya. Kemudian ekstrak sampel dalam metanol diuapkan kembali sehingga diperoleh ekstrak kental (crude).

4.2.3 Identifikasi pendahuluan menggunakan kromatografi lapis tipis

Ekstrak kental (crude) dilarutkan dalam metanol. Ambil dengan pipa kapiler, dan totolkan ke plat KLT 3 x 10 cm sebanyak 3-5 tetes (totalan). Kemudian dielusi dengan menggunakan eluen metanol : kloroform (1:9), Naim, dkk (1974). Elusi dilakukan setelah bejana penuh dengan uap eluen, dan didiamkan selama 5-10 menit.

Plat dikeringkan, kemudian tandai noda yang dihasilkan dengan pensil dan dideteksi dengan menggunakan lampu ultraviolet pada $\lambda=254$ dan 366 nm. Identifikasi noda kromatogram juga dilakukan dengan menggunakan uap amoniak. Noda yang diperoleh dikerok dan dilarutkan dalam metanol.

4.2.4 Karakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Diambil 2-3 mL fraksi metanol, dimasukkan dalam kuvet dan diukur spektrumnya pada panjang gelombang 200 – 335 nm. Blanko yang digunakan adalah metanol. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan pereaksi geser. Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi natrium metoksida, $AlCl_3$, HCl , serbuk natrium asetat anhidrat, dan serbuk H_3BO_3 . Pembuatan pereaksi tersebut dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Natrium metoksida

Sebanyak 2,5 gram logam natrium dipotong dengan hati-hati dan dimasukkan dengan hati-hati kedalam 100 mL metanol. Pereaksi ini disimpan dalam botol kaca bertutup plastik. Pereaksi pengganti yang cocok adalah $NaOH$ 2M.

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel akar kedelai dilakukan di daerah desa Besi jalan kaliurang jogjakarta. Bagian akar yang diambil dicuci dengan air mengalir hingga bersih, kemudian dipotong-potong menjadi bagian kecil-kecil dan selanjutnya dihaluskan dengan blender menjadi serbuk.

5.2 Ekstraksi Akar Kedelai

Sebelum dilakukannya proses ekstraksi, akar kedelai dipotong kecil-kecil dan dihaluskan dengan blender untuk memperkecil ukuran partikel, sehingga dapat memperbesar luas permukaan partikel yang menyebabkan interaksi antara pelarut dan senyawa yang akan diekstrak meningkat. Setelah dipotong-potong, kemudian sampel diangin-anginkan untuk mengurangi kadar airnya.

Sampel diekstraksi dengan ekstraktor soxhlet menggunakan pelarut n-heksana selama 5 jam. Ekstraksi dengan ekstraktor soxhlet merupakan cara yang efisien, karena kebutuhan pemanasan minimal dan pelarut yang digunakan dapat diperoleh kembali. Selain itu ekstraksi dengan ekstraktor soxhlet dilakukan untuk menghilangkan senyawa makro seperti, lemak, minyak, klorofil, xantofii, dan lain sebagainya, sehingga hanya senyawa yang diinginkan saja yang terdapat pada ekstrak n-heksana, seperti isoflavon dan senyawa flavonoid lainnya.

Hasil ekstraksi Soxhlet diperoleh ekstrak n-heksana kental dengan warna kuning kecoklatan, kemudian ekstrak kental tersebut selanjutnya diekstraksi lagi dengan kloroform untuk mengambil isoflavon. Senyawa isoflavon bersifat kurang polar, sehingga mudah larut dalam pelarut kurang polar juga seperti kloroform. Ekstrak kloroform dari 200 gram sampel akar kedelai yang diperoleh adalah sebagai berikut:

Berat hasil	: 0,38 gram
Bentuk fisik	: cairan kental
Warna	: kuning kecoklatan
Rendemen	: 0,19 %

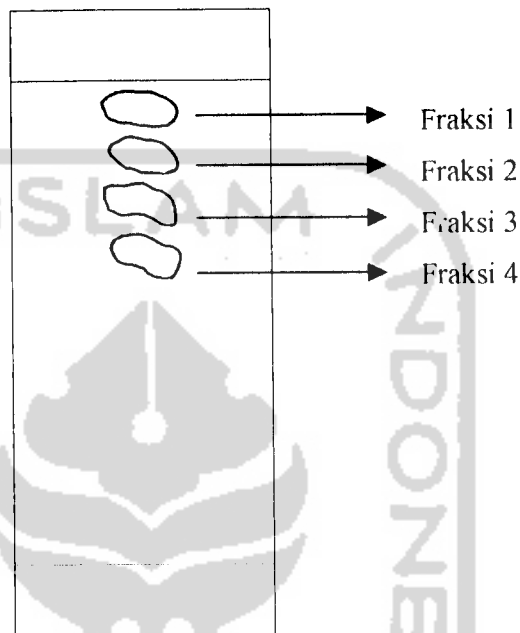
5.3 Hasil Pemisahan dengan KLT

Tabel 1 merupakan harga Rf dan warna yang dihasilkan oleh pemisahan noda pada KLT setelah dilihat dibawah lampu UV 366 nm.

Tabel 1. Harga Rf dan warna noda dengan lampu UV 366 nm

No. Noda	Rf	Warna pada UV 366 nm
1.	0,98	Biru
2.	0,88	Biru fluoresen
3.	0,83	Hijau
4.	0,75	Hijau fluoresen

Sedangkan gambar 1 adalah hasil pengembangan ekstrak metanol akar dengan KLT. Perbandingan eluen metanol : kloroform (1:9), menurut Naim, dkk (1974).



Gambar 2. Hasil pengembangan dengan Kromatografi Lapis Tipis menggunakan eluen metanol : kloroform (1:9)

Dari data tabel 1 dan gambar 2, berdasarkan deteksi secara kualitatif (warna noda) dan harga Rf yang dihasilkan setelah sampel yang ditotolkan pada plat KLT di deteksi dengan lampu UV, menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah suatu isoflavon, yaitu genistein (isoflavon aglikon). Beberapa kali pengulangan yang dilakukan terhadap pengembangan sampel pada plat KLT menunjukkan pemisahan noda pada Rf yang relatif sama dengan yang dilakukan sebelum dan sesudah uji warna dengan uap amoniak.

5.4 Penentuan Struktur Senyawa Isoflavon dengan Metode Uji Warna

Analisis untuk memastikan jenis senyawa isoflavon yang terdapat pada ekstrak akar kedelai dilakukan uji warna terhadap noda yang dihasilkan dengan menggunakan uap amoniak dan tidak terjadi perubahan warna noda pada KLT. Hal tersebut analog dengan ciri senyawa isoflavon yang berbeda dengan senyawa flavonoid lain yang menghasilkan perubahan warna noda apabila diberi uap ammonia, walaupun ada juga sebagian kecil senyawa flavonoid yang juga tidak mengalami perubahan warna pada noda apabila diberi uap amoniak.

Tetapi dengan harga $R_f = 0,98$ dan warna noda yang dihasilkan menunjukkan karakteristik senyawa genistein.

Tabel 2. Warna noda pada lampu UV 366 nm menggunakan uap NH₃

No. noda	Rf	UV 366 nm	
		Tanpa uap NH ₃	Dengan uap NH ₃
1.	0,98	Ungu	Ungu
2.	0,88	Biru flouresen	Biru flouresen
3.	0,83	Hijau	Hijau
4.	0,75	Hijau flouresen	Hijau flouresen

5.5 Analisis dengan Spektrofotometer Ultraviolet

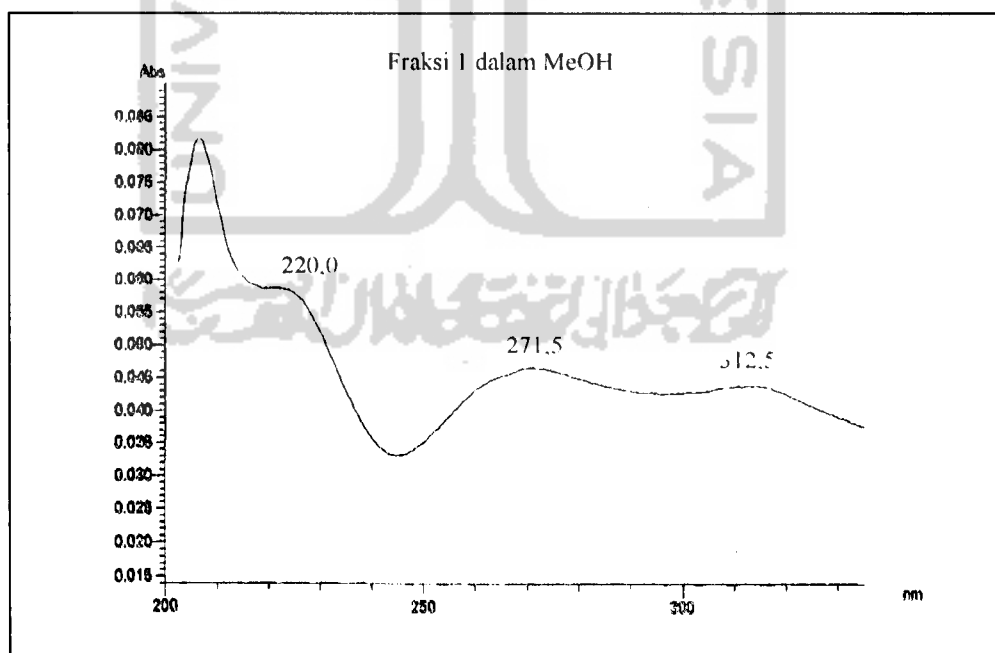
Analisis ini digunakan untuk membuktikan dugaan yang berasal dari identifikasi awal dengan KLT bahwa senyawa tersebut adalah isoflavon aglikon, dengan cara mengetahui panjang gelombang maksimum dan pergeseran batokromik yang terjadi pada saat ditamapkannya pereaksi geser ke dalam sampel dalam metanol.

Tabel 3 terlihat bahwa panjang gelombang maksimum yang dimiliki oleh sampel analog dengan senyawa genistein, yang menyerap pada panjang gelombang antara 245-275 nm (pita I), dan 300-330 nm (pita II), serta bahu pada 220 nm.

Tabel 3. Panjang gelombang maksimum fraksi 1 dalam metanol

Pereaksi	Panjang gelombang maksimum (nm)
Fraksi 1 dalam MeOH	220,0 ; 271,5 ; 312,5

Gambar 3 merupakan spektrum UV fraksi 1 dalam metanol, yang menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 271,5 nm (pita II), dan 312,5 nm (pita I) yang sesuai dengan panjang gelombang maksimum yang dimiliki oleh genistein, yang menyerap pada panjang gelombang antara 245-275 nm (pita I), dan 300-330 nm (pita II).



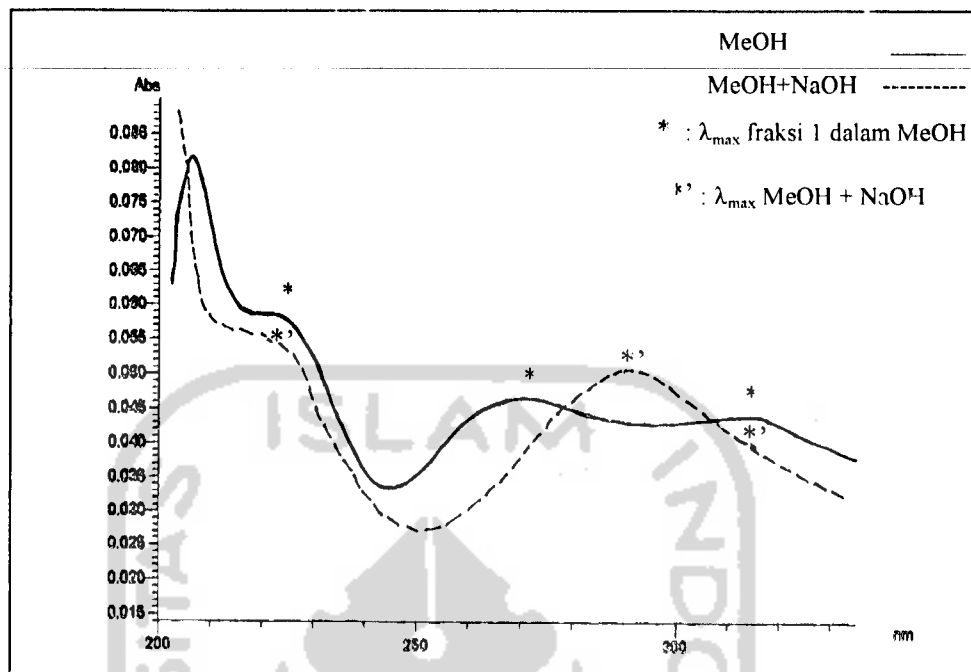
Gambar 3. Spektrum fraksi 1 dalam MeOH

Data spektrum ultraviolet isoflavon pada fraksi I dalam metanol dengan penambahan pereaksi geser menyebabkan perubahan panjang gelombang maksimum di pita I dan II, disebabkan karena adanya interaksi antara senyawa isoflavon dengan pereaksi geser yang ditambahkan untuk mengetahui pola hidroksilasinya. Hasil analisis spektrofotometer ultraviolet dengan penambahan pereaksi geser, menghasilkan pergeseran batokromik seperti terlihat pada tabel 4.

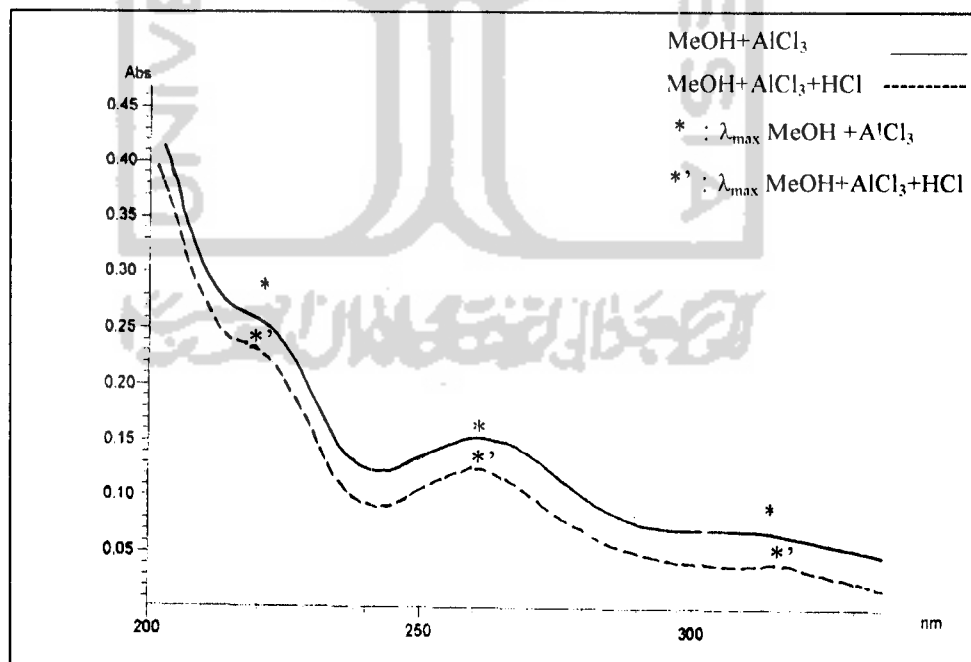
Tabel 4. Pergeseran batokromik pada penambahan pereaksi geser

Pereaksi	Pergeseran terhadap metanol		
MeOH/NaOH	-	18,0 nm	-
MeOH/NaOH/5 menit	-	14,0 nm	-
MeOH/AlCl ₃	1,5 nm	8,0 nm	3,5 nm
MeOH/AlCl ₃ /HCl	1,5 nm	8,0 nm	4,0 nm
MeOH/NaOAc	-	-	-
MeOH/NaOAc/H ₃ BO ₃	-	1,0 nm	-

Pada gambar 4 terlihat, penambahan NaOH menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 18 nm terhadap spektrum metanol pada pita II, yaitu pergeseran dari 271,5 nm menjadi 289,5 nm. Hal ini menunjukkan adanya 5-OH pada cincin A dan adanya 4'-OH pada cincin B. Spektrum ini biasanya merupakan petunjuk "sidik jari" pola hidroksilasi dan juga bermanfaat untuk mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Degradasi atau pengurangan kekuatan spektrum sebesar 4 nm dengan adanya penambahan waktu selama 5 menit setelah penambahan NaOH, yaitu dari 289,5 nm menjadi 285,5 nm merupakan petunjuk yang baik akan adanya gugus yang peka terhadap basa.

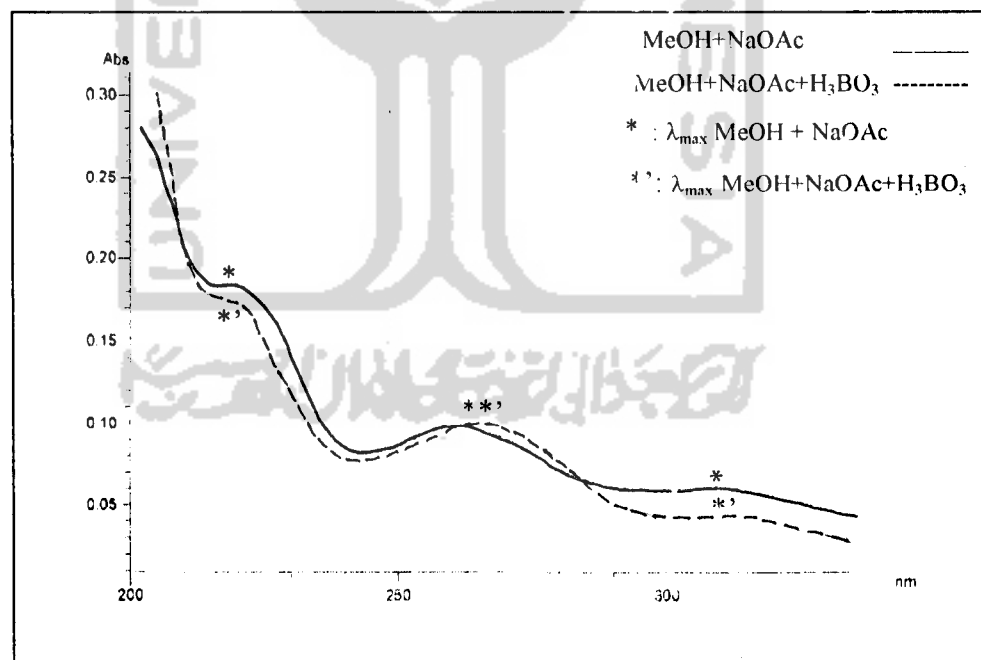


Gambar 4. Spektrum fraksi 1 dalam MeOH dan MeOH+NaOH



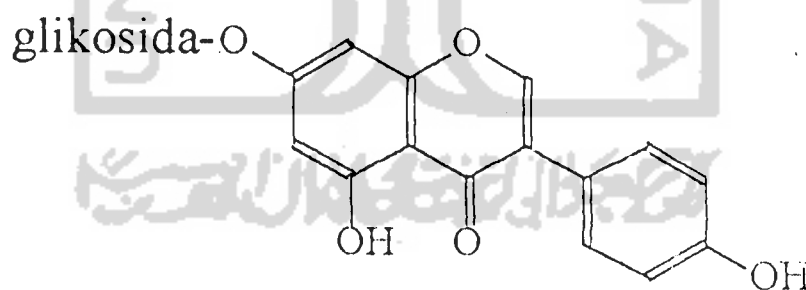
Gambar 5. Spektrum fraksi 1 dalam MeOH+AlCl₃ dan MeOH+AlCl₃+HCl

Gambar 5 menunjukkan spektrum pada penambahan AlCl_3 yang menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 8 nm terhadap spektrum metanol pada pita II, yaitu dari 271,5 menjadi 263,5 nm, dan pergeseran panjang gelombang sebesar 4 nm terhadap spektrum metanol pada pita I, yaitu dari 312,5 nm menjadi 308 nm. Hal ini menunjukkan adanya 5-OH pada cincin A dan keton di cincin C yang terikat pada C_4 . Penambahan HCl terhadap larutan AlCl_3 menyebabkan pergeseran panjang gelombang sebesar 0,5 nm terhadap spektrum metanol/ AlCl_3 pada pita I, yaitu dari 308 nm menjadi 308,5 nm. Interaksi yang terjadi antara isoflavon dengan AlCl_3 adalah reaksi kompleks yang tahan asam antara gugus 5-OH dan keton dengan ion logam Al dan interaksi kompleks tak tahan asam dengan 4'-OH.



Gambar 6. Spektrum fraksi 1 dalam $\text{MeOH}+\text{NaOAc}$ dan $\text{MeOH}+\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$

Spektrum ultraviolet dengan penambahan pereaksi natrium asetat tidak dihasilkan pergeseran panjang gelombang terhadap spektrum fraksi 1 dalam metanol, yang menunjukkan tidak adanya 7-OH dan tidak ada orto di-OH, atau dapat juga disebabkan oleh adanya glikosida di C7 pada cincin A. Penambahan natrium asetat hanya menyebabkan pengionan yang berarti pada gugus hidroksil isoflavon yang paling asam yang digunakan untuk mendeteksi adanya gugus 7-hidroksil bebas (atau yang setara). Sedangkan penambahan asam borat menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 1 nm, yang tidak menyebabkan pengaruh yang signifikan terhadap karakterisasi pola hidroksilasi pada C7. Penambahan asam borat digunakan untuk menjembatani kedua gugus hidroksil pada cincin A dan cincin B, yaitu mendeteksi adanya gugus orto dihidroksi. Tidak adanya pergeseran batokromik pada penambahan pereaksi NaOAc/H₃BO₃ menyebabkan tidak adanya orto dihidroksi, sehingga struktur senyawa fraksi 1 dalam metanol adalah sebagai berikut seperti terlihat pada gambar 7.



Gambar 7. Struktur Genistein 7-O-glikosida

Dari data-data tersebut diatas mendukung dugaan bahwa senyawa tersebut adalah senyawa isoflavon genistein 7-O-glikosida (5,4'-dihidroksiisoflavon-7-O-glikosida).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil pengamatan dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Diperoleh Rendemen hasil ekstrak akar kedelai kering dalam metanol sebesar 0,19 %
2. Fraksi 1 dari ekstrak metanol pada KLT menunjukkan $R_f = 0,98$; menggunakan eluen metanol : kloroform (1 : 9)
3. Berdasarkan spektrum ultraviolet dalam metanol dengan penambahan pereksi geser NaOH, $AlCl_3$, dan NaOAc, menunjukkan bahwa fraksi 1 adalah genistein 7-O-glikosida.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap penelitian ini, seperti:

1. Penelitian terhadap fraksi-fraksi lain hasil KLT
2. Fraksi-fraksi hasil KLT kemudian dapat dikromatografi kolom, sehingga dapat memberikan informasi senyawa isoflavon yang lebih spesifik
3. Hidrolisis enzim dan hidrolisis asam dapat dilakukan apabila senyawa isoflavon yang dihasilkan dalam bentuk glikosidanya

4. Penelitian terhadap batang dan daun kedelai pasca panen juga dapat dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa isoflavon apa saja yang terkandung dalam limbah tanaman kedelai pasca panen
5. penelitian lebih lanjut dapat dilakukan dengan menghitung kadar senyawa isoflavon yang terkandung dalam sampel *brangkasan* kedelai pasca panen.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1998, *Bio-transformasi Isoflavon pada Tempe dan Prospek pemanfaatannya untuk Kesehatan*
- Barz, W., Heskamp, Klus, K., Rheins, H. and Steinkamp, R., 1993, *Recent Aspect of Protein, Phytate and Isoflavon Metabolism by Microorganisms Isolated from Tempe-Fermentation*, Tempe Workshop, Jakarta
- Braun, R.D., 1982, *Introduction To Chemical Analysis*, Mc Graw Hill Book Company, New York, 342-345
- Darmawan, E., 2001, *Uji toksisitas Akut Sidaguri (Sida Rhombifilia, L.), Gletang (Tridax Procumbens, L.) dan Kedelai (Glycine max (L) Merr.) Terhadap Artemia Salina*, Leach, Lembaga Penelitian, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta
- Day, Jr., R.A., Underwood, A.L., 1986, *Quantitative Analysis*, Terjemahan Aloysius Pudjaatmaka, Ph.D., Edisi kelima, Erlangga, Jakarta
- Fujiki, H., Horiuci, T., Yamashita, K., Haki, H., Suganuma, M., 1986, *Inhibition of Tumor Promotion by Flavonoids, Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmaceutical and Structure-Activity Relationship*, Alan R. Liss Inc., New York, 471-480
- Ewan, Y.W., HA. Charles V. Morr, and Aiko Seo, 1992, *Isoflavone Aglicones and Volatile Organic Compounds In Soybeans; Effects of Soaking Treatments*, J. Food Science, 57 (2), 414-417
- Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Rogers, V., 1978, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Fourth Edition, The English Language Book Society and Longman, London, 130-132
- Geissman, T.A., 1962, *The Chemistry of Flavonoids Compounds*, Macmillan Co., New York
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., Schwarting, A.E., 1991, *Pengantar Kromatografi*, Terjemahan Kosasih Pedmawinata, edisi kedua, ITB, Bandung
- Gyorgy, S., Murata, K. and Ikehata, H., 1964, *Antioxidant Isolated from Fermented Soybean Nature*, J. Agric. Biol. Chem., 23 (4947), 870-872

Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Terbitan kedua, ITB, Bandung

Hendrich, S., Lu, Z., Wang, H.J., Hopman, E. and Murphy, P., 1996, *Soy Isoflavone International Symposium Fumonisin B₁-Promoted Rat Hepatocarcinogenesis*, Second Diseases, Brussel

Koster, J., Strack, D., 1983, *Planta Med.*, 48. 131

Kramer, R.P., Hindorf, H., Jha, H.C., Kallage, J. and Zilliken, F., 1984, *Antifungal Activity of Soybean and Chickpea Isoflavones and Their Reduces Derivates*, *Phytochemistry* (23), 2203-2205

Lamastiniere, C.A., Murril, B.W. and Brown, N.M., 1996, *Genistein Supresses Chemically-Induced Mammary Cancer.*, *Second International Symposium on the Role of Soybean In Preventing and Treating Chronic Diseases*, Brussel

Luckner, M., 1984, *Secondary Metabolism In Microorganisms, Plant and Animals*, Springer-Verlag, Berlin

Markham, K.R., 1988, *Techniques of Flavonoids Identification*, Terjemahan Dr. Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung

Murakami, H., Asakawa, T., Terao, J. and Matsushita, S., 1984, *Antioxidative stability of tempeh and liberation of Isoflavones by Fermentation*, *Agric. Biol. Chem.*, 48 (12), 2971-2975

Naim, M., Gestetner, B., Kirson, I., Birk, Y. and Bondi, A., 1973, *A New Isoflavon From Soya Beans*, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot

Naim, M., Gestetner, B., Zilkah, S., Birk, Y. and Bondi, A., 1974, *Soybean Isoflavones, Characterization, Determination, and Antifungal Activity*, *J. Agr. Food Chem.*, Vol. 22 (5), 806-810

Rukmana, R., 1996, *Kedelai; Budidaya dan Pascapanen*, Kanisius, Yogyakarta

Sastrohamidjojo, Dr., H., 1985, *Dasar-dasar Spektroskopi*, Liberty, Jogjakarta

Shigemitsu, K., Yvette Fleury, Daniele, M., 1991, *Malonyl Isoflavone Glycosides In Soybean Seeds (Glycine max (L) Merrill)*, *Agric Biol. Chem.*, 55 (9), 2227-2233

Snyder, H.E. and Kwon, T.W., 1987, *Soybean Utilization*, Van Nostrand Reinhold Co., New York

Suprpto, H.S., 1983, *Bertanam Kedelai*, Jakarta

Touchstone, J.C., Dobbin, M.F., 1983, *Practice of Thin Layer Chromatography*,
Second Edition, John Wiley & Sons Inc., New York

